

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg an der Lahn
(Direktor: Prof. Dr. F. Linneweh)

THESIS

MARBURG 1968

**– Die Ausscheidung einzelner saurer Mucopoly-
saccharide im Harn von Normalpersonen
verschiedenen Alters –**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Christian Krüger
aus Schöneu/Pom.

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153305_0086

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg an der Lahn
(Direktor: Prof. Dr. F. Linneweh)

**– Die Ausscheidung einzelner saurer Mucopoly-
saccharide im Harn von Normalpersonen
verschiedenen Alters –**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Christian Krüger
aus Schöneu/Pom.

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 9. 7. 1968
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. R. Siegert
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. W. Teller
Correferent: Prof. Dr. med. G.W. Löhr

Inhalt:

	Seite
I. Einleitung:	
Saure Mucopolysaccharide:	
Chemie	1
Vorkommen	3
Synthese	4
Funktion	4
Pathologie	4
Ausscheidung	5
Methoden zur Bestimmung saurer Mucopoly- saccharide im Harn	6
II. Fragestellung	6
III. Material und Methoden:	
Harnsammlung und Altersgruppen-Einteilung	7
Chemikalien	8
Aufarbeitungsgang einschließlich Säulen- chromatographie und Versuchsanordnung	9
Carbazol-Reaktion	15
Anthron-Reaktion	15
Papierchromatographie	16
Kreatininbestimmung	17
Statistische Methoden	17
IV. Ergebnisse:	
Streuungsbreite der Methode	18
Ausscheidung einzelner saurer Mucopoly- saccharide bei Säuglingen, Kleinkindern, Präadoleszenten, Adoleszenten und Er- wachsenen	19
V. Diskussion	29
VI. Zusammenfassung	34
VII. Literaturverzeichnis	35

I. Einleitung:

Die Bedeutung der Mucopolysaccharide wurde erkannt, als man begann, systematisch menschliche und tierische Gewebe nach dieser Stoffklasse zu untersuchen. Anregung dazu gab die Beobachtung, daß einige Bindegewebskrankheiten in enger Beziehung zum Mucopolysaccharidstoffwechsel stehen. So erkannte B r a n t e (1952) die Pfaundler-Hurler'sche Erkrankung (Gargoylismus) als eine Störung im Mucopolysaccharidstoffwechsel. Bei dieser Krankheit besteht fast immer eine erheblich vermehrte Ausscheidung von Chondroitinsulfat B und Heparitinsulfat im Harn.

Zum besseren Verständnis der Problemstellung dieser Arbeit sei einleitend ein kurzer Abriß über die Chemie, die Eigenschaften und das Vorkommen der sauren Mucopolysaccharide gegeben. Von den bisher bekannten acht sauren Mucopolysacchariden (Heparin, Heparitinsulfat (HS), Chondroitin, Chondroitinsulfat A, B, C (CSA/CSB/CSC), Keratinsulfat (KS) und Hyaluronsäure (HA)) sind im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit fünf Polysaccharide, HS, CSA, CSB, CSC und KS, von besonderer Bedeutung, weil sie regelmäßig nachweisbare Bestandteile des menschlichen Harnes sind. HA wurde von D i F e r r a n t e (1957) und G i b b i a n (1953) ebenfalls gefunden, doch konnten diese Ergebnisse von B e r e n s o n und D a l f e r e s (1965) weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu den neutralen Mucopolysacchariden, die zu den Glycoproteiden gerechnet werden, handelt es sich bei den sauren Mucopolysacchariden (SMP) chemisch um anionische Heteropolysaccharide, die alternierend eine Uronsäure und einen Aminosucker enthalten, der wiederum eine Sulfatgruppe trägt. Die

Grundeinheit dieser Fadenmoleküle besteht somit aus einem Disaccharid. Diesem Strukturprinzip entsprechen alle SMP, außer KS, das aus Galaktose und N-Acetylglucosamin besteht. (Übersichten s. Meyer (1958), Hoffman et al. (1958) und Jeanloz (1958)). In Tab. 1 sind die fünf genannten SMP bezüglich Nomenklatur und Zusammensetzung übersichtlich zusammengestellt. Abb. 1 gibt die Strukturformeln von CSA, CSC, CSB, HA und KS wieder.

Trivialname	Neue chem. * Bezeichnung	Weitere Synonyma	Abkür- zung	Bestandteile Amino- Uron- zucker säure	
Heparitin- sulfat	Heparan- sulfat	Heparin- monosulfat	HS	Glucos- amin, N- Acetyl- glucos- amin	D-Glu- curon- säure
Chondroi- tinsulfat A	Chondroitin- 4-sulfat	-	CSA	N-Ace- tylgalak- tosamin	D-Glucu- ron- säure
Chondroi- tinsulfat C	Chondroitin- 6-sulfat	-	CSC	N-Ace- tylgalak- tosamin	D-Glucu- ron- säure
Chondroitin- sulfat B	Dermatan- sulfat	ß-Heparin	CSB	N-Acetyl- galaktos- amin	L-Idu- ron- säure
Kerato- sulfat	Keratan- sulfat	-	KS	N-Ace- tylglu- cosamin	(D-Galak- tose)

* Gemäß dem Vorschlag von Herrn Prof. Dr. K. Meyer, New York, zur Polysaccharid-Nomenklatur, American Chemical Society, Mai 1959.

Tab. 1: Nomenklatur und Zusammensetzung der im menschlichen Urin vorkommenden sauren Mucopolysaccharide.

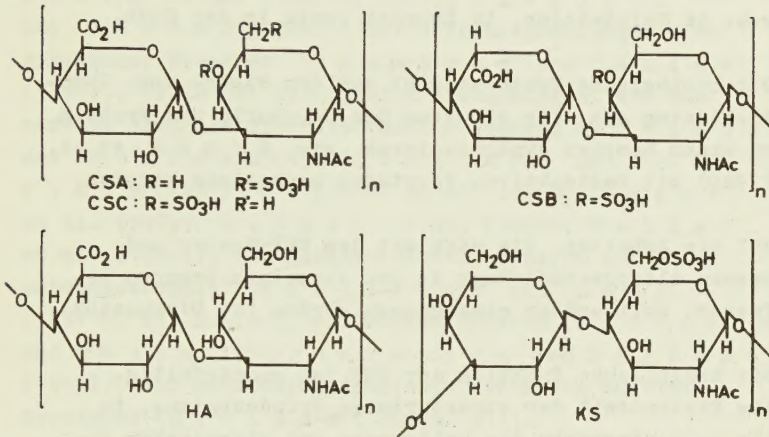


Abb. 1: Strukturformeln der Disaccharid-Einheiten
verschiedener saurer Mucopolysaccharide

Während die Strukturaufklärung der Chondroitinsulfate weitgehend abgeschlossen ist (Davidson und Meyer (1954)), sind vom Heparin lediglich die Hauptbestandteile bekannt.

Die SMP kommen im Gewebe als Mucopolysaccharid-Proteinkomplexe mit Molekulargewichten zwischen 15 000 und mehreren Millionen vor (Mathews und Lozaityte (1958), Mathews und Dorfman (1953), Bernardi (1957), Webber und Bayley (1956)). Neuerdings diskutiert man im Bindegewebe eine Protein-Kollagen-SMP-Bindung über Serinbrücken (Gross, Mathews und Dorfman (1960)).

Die SMP befinden sich in der Natur vorwiegend in der Grundsubstanz von Geweben mesenchymalen Ursprungs, u.a. in Gefäßwänden, im Knorpel sowie in der Haut.

Die biologische Synthese geht von den Fibro- bzw. Chondroblasten aus, die simultan das Saccharid und Protein zu einem Komplex synthetisieren, wie G r o s s et al. (1960) mit radioaktiven Vorstufen nachweisen konnten.

Auf die Arbeiten, die sich mit dem SMP-Muster und dessen Altersveränderung in den einzelnen Organen befassen, soll später eingegangen werden (s. Diskussion).

Die biologische Funktion der SMP ist mannigfaltig. Als Bestandteil der strukturlosen Grundsubstanz, in die im Bindegewebe die kollagenen und elastischen Fasern, sowie die Zellen eingelagert sind, greifen sie als anionische Elektrolyte in viele biochemische Abläufe des Stoffwechsels ein (D o r f m a n (1958)). So haben sie Anteil an der Calcifizierung der Knochen (B o y d und N e u m a n (1951), D z i e w i a t k o w s k i et al. (1948), D z i e w i a t k o w s k i (1952 u. 53) und D u l c e (1960)), an der Wundheilung (D u n p h y und U d u p a (1955)), an der Blutgerinnung (G r o s s m a n und D o r f m a n (1957)), sowie am Haarwachstum (M e y e r et al. (1961)).

Bei pathologischen Prozessen des Bindegewebes bzw. des Knorpels, die mit einer SMP-Muster-Verschiebung in diesen Geweben einhergehen, sind quantitative und qualitative Veränderungen der SMP-Exkretion im Harn gefunden worden, z.B. bei Kollagenkrankheiten (D i F e r r a n t e et al. (1957), D i F e r r a n t e (1957), B o n o m o und C e r r e t e l l i (1957)), neoplastischen Erkrankungen (B o n o m o und C e r r e t e l l i (1957)), Arteriosklerose und primär chroni-

scher Polyarthrititis (D e l b r ü c k et al. (1967), H a u s s et al. (1962 u. 1963), T h o m p s o n und C a s t o r (1966)), bei Nierenerkrankungen verschiedener Ursachen (T h o m p s o n und C a s t o r (1966)), sowie bei hereditären Erkrankungen, wie das bereits erwähnte Pfaundler-Hurler-Syndrom (L o r i n c z und D o r f m a n (1957), D o r f m a n und L o r i n c z (1957), M e y e r et al. (1958), M e y e r et al. (1959), L i n k e r et al. (1962), T e l l e r et al. (1962)), das Morquio-Ullrich-Syndrom (Chondroosteodystrophie) (M a r o t e a u x und L a m y (1961 u. 63) u.a.m.), das Marfan-Syndrom (B e r e n s o n und S e r r a (1959), B e r e n s o n und D a l f e r e s (1965)), die Osteoonychodysplasie sowie die multiple Exostosen (L o r i n c z (1960 u. 61)).

Die Anwesenheit von sauren Mucopolysacchariden im normalen menschlichen Harn ist schon seit längerem bekannt (M ö r n e r (1895), K o b a y a s (1938) und A s t r u p (1947)), während die quantitativen SMP-Bestimmungen und die Ermittlung des SMP-Musters erst in den letzten Jahren nach Entwicklung zuverlässiger biochemischer Methoden gelang. Eine Abnahme der Gesamtmucopolysaccharidausscheidung mit zunehmendem Alter, sowie geschlechtsbedingte Differenzen konnten festgestellt werden (R i c h et al. (1957), R e c h e n b e r g e r (1960), B e r e n s o n und D a l f e r e s (1965) sowie S p r a n g e r et al. (1967)).

Der Ausscheidungsmechanismus der SMP ist noch unklar. Eine Kombination von passiver glomerulärer Filtration und aktiver tubulärer Sekretion wird diskutiert (K e r b y (1954), P i p e r (1947), R e c h e n b e r g e r (1960), K a p l a n und M e y e r (1962)). - Im Unterschied zu Gewebsmucopolysacchariden lassen sich die SMP im Harn besonders gut durch chemische Bestimmungsmethoden

erfassen, da sie in der Niere größtenteils von ihrem Eiweißbestandteil abgetrennt werden und daher nicht mehr einem proteolytischen Prozeß unterzogen werden müssen.

Einige der gebräuchlichsten Methoden zur Gesamtbestimmung von SMP im Harn seien summarisch aufgeführt, ohne im einzelnen besprochen zu werden: Benzidinmethode (A s t r u p (1947)), Dimethylaminomethylbenzofuran-Methode (M a r b e t und W i n t e r s t e i n (1951)), Albumin-Methode (D o r f m a n und O t t (1948)) und die Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-od. Cetylpyridinchlorid (CPC)-Methode (D i F e r r a n t e und R i c h (1956), R i c h und M y e r s (1959), T e l l i e r et al. (1962)).

II. Fragestellung:

Wie erwähnt, spielen die SMP im Bindegewebsstoffwechsel des tierischen und menschlichen Organismus eine bedeutende Rolle. Darüber hinaus gehen einige angeborene und erworbene Krankheiten des Bindegewebes mit einer pathologischen SMP-Ausscheidung im Urin einher, was diagnostisch verwertet werden kann. Seitdem man weiß, daß der physiologische Alterungsprozeß mit Veränderungen im SMP-Muster einzelner Organe verbunden ist, erschien es von Interesse, die SMP-Muster im Urin während verschiedener Altersstufen zu bestimmen und zu den bereits bekannten SMP-Altersveränderungen in Geweben wie Aorta, Haut und Knorpel in Beziehung zu setzen.

III. Material und Methoden:

Es wurden 24-Stunden-Harne von Personen verschiedenen Alters aus der Chirurgischen- und Kinderklinik und von Normalpersonen, die nicht hospitalisiert waren, gesammelt. Die Vollständigkeit der Harne wurde durch Kreatininbestimmung geprüft. Nur Urine, die mehr als 15 mg/kg/24^h enthielten, gelangten zur Aufarbeitung. Die Auswahl der Personen wurde nach dem Alter und Entwicklungsgrad vorgenommen, wobei innerhalb der Altersgruppen die Wahl zufällig war. Es wurde keine Einteilung nach dem Geschlecht vorgenommen.

Die Einteilung des Untersuchungsgutes erfolgte in 5 Gruppen:

1. Säuglinge (bis 42 Tage alt)
2. Kleinkinder (2 bis 7 Jahre)
3. Praeadoleszenten (8 bis 12 Jahre) (Entwicklungsstadium 1-2 nach Tanner, 1962)
4. Adoleszenten (13 bis 19 Jahre) Entwicklungsstadium 5)
5. Erwachsene (älter als 20 Jahre)

Die Kriterien der Klassifizierung waren bei den Praeadoleszenten: beginnende Schambehaarung, beginnende Brustentwicklung (Durchmesser größer als 2 cm) und Knochenalter älter als 9 Jahre; bei den Adoleszenten waren die sekundären Geschlechtsmerkmale voll entwickelt mit Menarche bzw. Ejakulation und einem Knochenalter älter als 13 Jahre.

Unter den für die Untersuchung als "normal" akzeptierten Patienten waren sechs mit Endokrinopathien (Pubertas praecox, Hypogonadismus, Adipositas), drei mit Unverträglichkeit im ABO-System und acht mit kleineren und mittleren chirurgischen Erkrankungen, die nicht chronischer Natur waren.

Chemikalien:

Dowex 1 X 2 200/400 mesh (Fluka, Ionenform: Cl^- ,
Schüttgewicht $0,72 \text{ g/cm}^3$, Feuchtigkeitsgehalt: 68-77%).
Cetavlon (CTAB): n-Hexadecyl-Trimethylammonium-
bromid, purum (Fluka).
Cetylpyridinchlorid (CPC): Hexadecyl-pyridinium-
chlorid, purum (Fluka).
Carbazol, sublimiert (Fluka).
Anthron für die Chromatographie (Merck).
Alcianblau 8 GS (Chroma).
Chromatographiepapier: Schleicher u. Schüll 2043 a,
ungewaschen, Bögen geschnitten $18 \times 40 \text{ cm}$ (Lauflänge).
Chromatographietanks (Desaga), rund $60 \times 30 \text{ cm}$.
Dialysierschläuche 8 u. 10 cm breit (Kalle).
Kochsalz, p.a. (Merck).
Eisessig, p.a. 99-100 % (Merck).
Konz. Schwefelsäure 95-97 % (Merck).
Konz. Isopropanol, p.a. 99,7 % (Riedel De Haën AG).
Ammoniumtartrat, rein (Riedel De Haën AG).
Reinsubstanzen: Chondroitinsulfat A
Chondroitinsulfat B
Chondroitinsulfat C
Heparitinsulfat

Methode :

Zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der SMP im Harn wurde die Methode von T e l l e r und Z i e m a n n (1966) angewandt. Dabei wird das mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) bzw. Cetyltrimethylpyridiniumchlorid (CPC) aus dem Harn gefällte SMP-Material an einem anionischen Ionenaustauscher (Dowex 1 x 2) adsorbiert und mit steigenden Konzentrationen von NaCl stufenweise eluiert. (S c h i l l e r und S l o v e r (1960), S c h i l l e r et al. (1961), L o r i n c z (1961)).

Mit gereinigten Substanzen konnte die Reihenfolge der Elution der verschiedenen SMP geprüft werden (M a r o t e a u x und L a m y (1963), H a r u k i und K i r k (1964), T e l l e r und Z i e m a n n (1966) und S p r a n g e r et al. (1967)):

NaCl-Konz.

1,25 m	----	Heparitinsulfat (HS)
1,50 m	----	Chondroitinsulfat A u. C (CSA, CSC)
2,00 m	----	Chondroitinsulfat B (CSB) und Heparin
3,00 m	----	Keratosulfat (KS)

Die anfängliche Elution mit 0,5 m NaCl dient der Reinigung der Säule, allerdings kann sie auch zur Darstellung von Hyaluronsäure (HA) dienen. Mit dieser Salzkonzentration haben H a r u k i und K i r k (1964) HA aus Geweben extrahiert. L o r i n c z (1961) und S c h i l l e r und S l o v e r (1960) verwandten dazu jedoch 0,4 m NaCl.

Aliquote Teile der in 6 ml-Fraktionen aufgefangenen Eluate werden Farbreaktionen unterworfen und colorimetrisch auf Hexuronsäure und Hexose geprüft. Die eingeeengten und gepoolten Fraktionen können nach Entsalzung papierchromatographisch auf die Vollständigkeit der Trennung geprüft werden.

Zur übersichtlichen Darstellung ist der Aufarbeitungsgang in Abb. 2 schematisch zusammengefaßt.

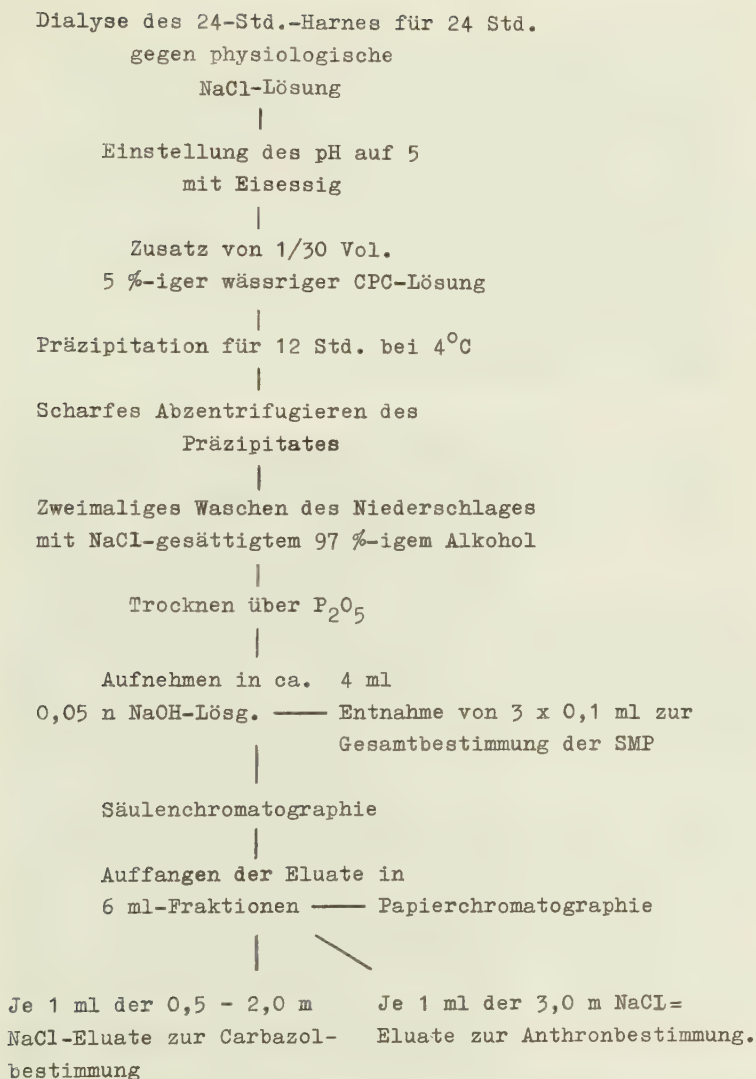


Abb. 2: Aufarbeitungsgang zur Säulenchromatographie
saurer Mucopolysaccharide im Harn.

Einzelheiten des Aufarbeitungsganges:

Von dem 24 -Std.-Harn werden ca. 3 ml zur Kreatininbestimmung abgenommen. Eine Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung in Zellophanschläuchen für 24 Std. reinigt den Harn weitgehend von dialysablen Substanzen. Während dieses Vorganges ist das Außenmedium mehrmals zu wechseln, um in der festgelegten Zeit bei maximaler Konzentrationsdifferenz eine genügende Dialyse zu erreichen. - Die Verlängerung der Zeit birgt die Gefahr des Substanzzerfalles, was in einzelnen Versuchen nachgeprüft wurde.

Im Anschluß an die Dialyse wird der meist schwach saure oder basische Harn mit Eisessig auf pH-5 eingestellt und mit einem dreißigstel Volumen 5 %-iger CPC-Lösung (od. CTAB) versetzt.

Die Ausfällung des CPC-SMP-Komplexes findet in den nächsten 12 Stunden im Kühlschrank bei 4°C statt. Das Präzipitat wird dann bei 3000 U/min. 25 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Trocknung des Rückstandes erfolgt im Exsikkator über P₂O₅ unter vermindertem Druck.

Es hat sich als zweckmäßig herausgestellt, das getrocknete Material schon am Tage vor der Säulenchromatographie in 0,05 n NaOH-Lösg. aufzunehmen, um eine vollständige Lösung der SMP zu gewährleisten. Die nicht gelösten Bestandteile werden abzentrifugiert und verworfen, da sie zur Verstopfung der Säule führen würden.

Die SMP-Lösung wird auf ein bestimmtes Volumen (in der Regel 4 ml) aufgefüllt, und davon werden 3 x je 0,1 ml für die Carbazolgesamtbestimmung abpipettiert.

Säulenchromatographie:

Die in diesen Versuchen verwandte Säule hat die Innenmaße 44 x 1 cm. Außen ist sie von einem Glasmantel umgeben, der mit Wasser konstanter Temperatur beschickt wird. Von dem unten konisch zugespitzten Ende der Säule führt ein Schlauch, dessen Lumen und somit Durchflußgeschwindigkeit mit einer Schraubklemme reguliert werden kann, zum Syphon bzw. Tropfenzähler des Fraktionensammlers. Mit Hilfe eines Schliffansatzes werden die Salzlösungen aus einem Scheidetrichter zur Elution auf die Säule gebracht. Ein Thermostat sorgt für die Konstanthaltung der Manteltemperatur der Säule von 26°C. (Einzelheiten s. Abb. 3)

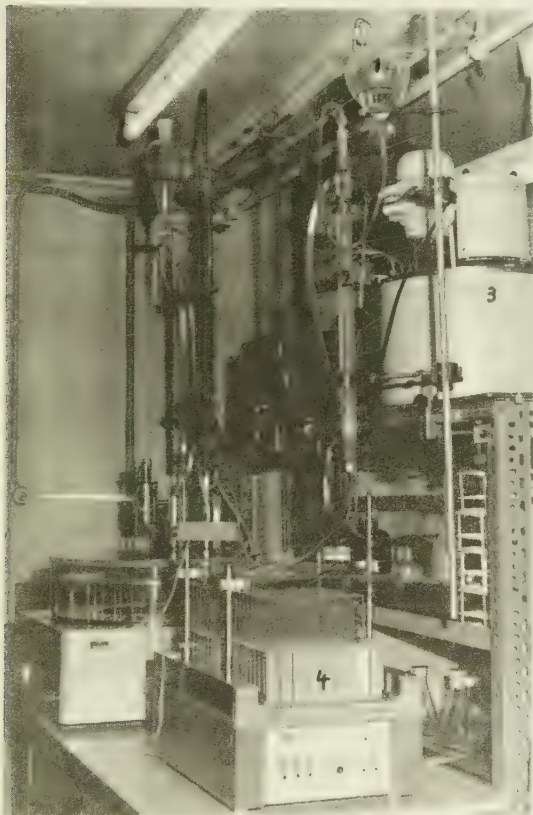


Abb. 3:

Versuchsanordnung:
Die in den Scheidetrichter eingebrachten Salzlösungen eluieren stufenweise das Mucopolysaccharid-Material, das auf das Austauschharz (Dowex 1X2) in der Chromatographiesäule gegeben wurde. Das Eluat wird mit einem Fraktionensammler in 6 ml-Fractionen aufgefangen.

- 1) Scheidetrichter
- 2) Chromatographiesäule
- 3) Thermostat
- 4) Fraktionensammler

Die Füllung der Säule mit dem Austauscherharz hat homogen und blasenfrei zu erfolgen. Das untere Ende des Glasrohres wird zuerst mit Glaswolle verstopft, die angefeuchtet mit Hilfe eines Glasstabes in das Säulenende bei einem Wasserstand von ca. 10 cm eingebracht wird. Im Anschluß daran wird die Suspension von Dowex eingefüllt und die vorher geschlossene Schraubklemme am Ausflußschlauch geöffnet. - Zu beachten ist, daß der Spiegel der sedimentierten Dowex-Teilchen stets unterhalb des Flüssigkeitsspiegels steht. Ein Trockenlaufen der Säule wirkt sich nachteilig auf die Trennung aus.

Nach diesen Vorbereitungen kann die SMP-Lösung aufgetragen und die Elution mit NaCl-Lösung niedrigster Konzentration begonnen werden. Die Elutionsgeschwindigkeit liegt bei ca. 0,5 ml/min. Die Anzahl der Fraktionen beträgt für 0,5 m NaCl 6-8, für 1,25 m, 1,5 m und 2 m NaCl 18-22 und für 3 m NaCl 10. Die obere Grenze der genannten Bereiche darf über-, die untere jedoch nicht unterschritten werden, da sonst eine exakte Trennung nicht gewährleistet ist.

Carbazolreaktion zur Hexuronsäurebestimmung:

Es handelt sich um eine Farbreaktion des Carbazols mit Hexuronsäuren. Diese werden durch Hydrolyse aus den SMP freigesetzt. Es wird im einzelnen wie folgt vorgegangen: Aus jeder Fraktion (Eluate mit 1,25-2,0 m NaCl) der Säule wird 1 ml entnommen und mit 6 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Nach kräftigem Schütteln werden die Proben auf 100°C für 20 Minuten im Glycerinbad erhitzt und anschließend abgekühlt. Nach Zugabe von 0,2 ml einer 0,1 %-igen alkoholischen Carbazollösung zu jeder Fraktion erfolgt abermals Schütteln. Nach zweistündigem Stehenlassen im Dunkeln entwickelt sich eine weitgehend lichtstabile rötliche Farbe. Sie wird im Coleman-Photometer bei einer Wellenlänge von 530 m μ gegen den Reagenzien-Nullwert (statt 1 ml Eluat Aquadest) abgelesen.

Die erhaltenen Werte werden als Elutionsdiagramm (s. Abb. 4a-d) graphisch dargestellt. - Bei der Eichkurve mit Glucuronolacton entsprechen 10 μ g einer Extinktion von 0,1.

Ähnlich verfährt man bei der Carbazolgesamtbestimmung vor der Säulenchromatographie: 0,1 ml SMP-Ausgangsmaterial werden bis auf 1 ml mit Aquabidest aufgefüllt. Bei der Messung wird zusätzlich zum Reagenzien-Nullwert ein Substanz-Leerwert (ohne Carbazol) abgezogen.

Anthronreaktion zur Hexosebestimmung:

Es handelt sich dabei um eine Farbreaktion, die gebundene Hexosen nachweist, wie sie als Galaktose im Keratosulfat vorhanden sind:

Je 1 ml wird aus jeder Fraktion (Eluate mit 3,0 m NaCl) entnommen und mit 6 ml Anthronreagenz versetzt. Dieses Reagenz muß frisch angesetzt werden, indem man 1 g Anthron

in 475 ml konz. Schwefelsäure löst und mit Aquabidest langsam im Eisbad auf 600 ml auffüllt. Nach intensivem Schütteln werden die Proben 10 Minuten lang im Glycerinbad auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlung erfolgt die Colorimetrie im Coleman-Photometer bei 620m μ gegen den Reagenzien-Nullwert.

Papierchromatographie:

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Papierchromatographie zur Prüfung der säulenchromatographischen Trennung verwandt. Die Fraktionen im Bereich eines Gipfels werden vereinigt und gegen Aquabidest bis zur Entsalzung dialysiert. Anschließend erfolgt die Einengung im Rotationsverdampfer bei 45°C auf ca. 1-2 ml. Dieses Material wird dann auf das Papierchromatogramm aufgetragen.

Vorbereitung und Herstellung der Lösung zur Entwicklung der Papierchromatogramme: Eine 0,04 m Ammoniumtartrat-Lösung wird mit Ameisensäure auf pH=4 eingestellt und mit Isopropanol im Verhältnis 60 : 40 gemischt. - Der mit Chromatographiepapier ausgeschlagene Chromatographietank wird mit dieser Lösung 12 Stunden lang bei 26°C äquilibriert.

Das Chromatogramm benötigt etwa 4 Stunden zur Äquilibration, bevor die absteigende Entwicklung erfolgt. Die Laufzeit beträgt etwa 12 Stunden.

Die Anfärbung der Chromatogramme wird mit einer Alcianblau-Essigsäure-Lösung durchgeführt (10 g Alcianblau in 1 l einer 9 : 1 Mischung Essigsäure/Aquadest). - Die überschüssige Farbe wird mit konz. Essigsäure entfernt und dann das Chromatogramm mit Leitungswasser gespült. Die SMP-Zonen bleiben dunkel-blau gefärbt, während sich der

Hintergrund aufluchtet. Die Empfindlichkeit liegt für Heparin bei $0,5 \mu\text{g}$ und für CSA bei $2,0 \mu\text{g}$.

Kreatininbestimmung:

1 ml eines 1 : 50 verdünnten und filtrierten Harns wird mit 1 ml 1,2 %-iger Pikrinsäure und 0,5 ml einer 10 %-igen NaOH-Lösung versetzt. Die sich entwickelnde gelbliche Farbe wird nach 12 Minuten gegen den Reagenzien-Nullwert (statt Harn 1 ml Aquadest) im Eppendorf-Photometer bei Normalblende und Filter E 546 photometriert. Zwischen Extinktion und mg % besteht folgende Beziehung:

$$E (\text{Extinktion}) \times 50 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 18,9 = \\ \times \text{mg \% Kreatinin.}$$

Statistische Berechnung:

Unterschiede und Eigenschaften (Homo- und Heterogenität) der Meß-Kollektive einschließlich der Signifikanzen wurden nach M i t t e n e c k e r (1964) berechnet:

$$\text{Mittelwert: } M = \frac{\sum X}{N}$$

$$\text{Standardabweichung: } S = \sqrt{\frac{\sum x^2}{N-1}} = \sqrt{\frac{(X_1-M)^2 + (X_2-M)^2 + \dots}{N-1}}$$

Homo- und Heterogenität der Standardabweichung wurden nach der F-Verteilung unter Bildung des Quotienten s_1/s_2 ermittelt. Zur Berechnung des Stichprobenfehlers der Mittelpunktsdifferenz bei homogener Varianz wurde folgende Formel verwandt:

$$S_{\text{diff.}} = \sqrt{\frac{\sum x_1^2 + \sum x_2^2}{N_1 + N_2 - 2} \left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}$$

Die Signifikanzen wurden aus der Tabelle der S t u d e n t-Verteilung ermittelt.

$$\text{Stichprobenfehler des Mittelwertes: } S_M = \frac{S}{\sqrt{N}}$$

IV. Ergebnisse :

Um die Streuungsbreite der Methode zu überprüfen, haben wir fünf 24-Std.-Harne von Kleinkindern vereinigt, dann in fünf gleiche Volumina aufgeteilt und jeden Teil einzeln aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 dargestellt. Bei der Auswertung ergab sich für die Carbazolgesamtbestimmung eine Standardabweichung von $s = \pm 0,0476$ und ein Stichprobenfehler des Mittelwertes von $s_M = \pm 0,0213$. Für die einzelnen Mucopolysaccharide betrug nach der chromatographischen Trennung der Stichprobenfehler des Mittelwertes: HS : $s_M = \pm 0,0213$, CSA : $s_M = \pm 0,308$, CSB : $s_M = \pm 0,369$.

Ver- such	Carb.abs. mg/24 Std.	HS (%)	CSA (%)	CSB (%)
1	0,860	30,90	60,20	8,90
2	0,852	30,90	58,80	10,30
3	0,908	32,10	57,60	10,30
4	0,772	31,40	58,80	9,80
5	0,800	30,00	59,00	11,00
	M=0,838	M=31,06	M=58,88	M=10,06
	$\pm 0,047$	$\pm 0,688$	$\pm 0,826$	$\pm 0,825$

Tab. 2: Streuung der SMP-Verteilungsmuster bei wiederholter Fraktionierung gleicher Teile eines Sammelurins von fünf Kleinkindern.

Normalpersonen aller Altersgruppen scheiden mehr Chondroitinsulfat A als Heparitinsulfat und Chondroitinsulfat B aus. Abb. 4a - d zeigen die graphischen Darstellungen der typischen SMP-Muster im Harn eines Säuglings, Kleinkindes, Adoleszenten und Erwachsenen. Die Chromatogramme der Gruppe Praeadoleszenten zeigen fast gleiche SMP-Verteilung wie die Gruppe der Kleinkinder. Das Papierchromatogramm der SMP-Fraktionen eines Adoleszenten ist in Abb. 5 wiedergegeben, wobei das Material der vereinigten und eingeengten Fraktionen im Vergleich zu gereinigten SMP chromatographiert wurde.

Der erste Gipfel stellt das Carbazol-positive Material dar, das mit einer NaCl-Konzentration von 1,25 m aus der Säule eluiert wurde. Im Papierchromatogramm erweist sich dieses Material als HS.

Der zweite Gipfel stimmt mit CSA und der dritte mit CSB papierchromatographisch überein.

Die HS- und CSB-Fraktionen der Säule zeigen eine gewisse Verunreinigung mit einer Substanz, die eine Laufgeschwindigkeit wie CSA hat. Die in dieser Arbeit angegebenen Werte für HS und CSB dürfen demnach etwas höher als die absoluten liegen.

KS war nur in Spuren nachweisbar und konnte im verwendeten papierchromatographischen System nicht auf Reinheit geprüft werden.

In der Tab. 3 sind die von uns ermittelten absoluten und relativen Carbazol-Werte der SMP im Harn bei 37 Personen verschiedenen Alters zusammengestellt.

Tab. 3: Verteilung des carbazolpositiven Materials nach säulenchromatographischer Fraktionierung der sauren Mucopolysaccharide im Harn.

Name	Geschl.	Alter	Carb./ Kreat.	Carb.abs. mg/24 Std.	HMS	CSA	CSB	KS
SÄUGLING								
Ha.	m	42 T.	12,90	0,756	39,0	53,6	7,4	Spur
No.	m	20 T.	31,40	1,005	38,0	53,2	8,7	Spur
So., H.	m	10 T.	27,10	1,130	40,5	45,0	14,5	Spur
Ge.	m	28 T.	25,00	0,946	35,0	48,0	17,0	Spur
Ia.	m	12 T.	32,50	1,300	40,7	51,8	7,5	Spur
Ma.	w	27 T.	9,26	0,815	45,2	40,1	14,7	-
Br.	m	8 T.	30,80	1,150	46,2	44,5	9,2	Spur
					40,7 ⁺ 4,41	48,1 ⁺ 5,11	11,31 ⁺ 3,92	
KLEINKIND								
Sch.	m	2 1/2 J.	11,40	3,76	29,3	60,0	10,7	Spur
B., E.	w	4 1/2 J.	5,46	2,37	29,4	59,0	11,6	-
B., A.	m	5 J.	9,20	2,31	39,0	50,2	10,2	Spur
R., B.	w	5 1/2 J.	19,10	5,30	37,1	49,9	13,6	Spur
Wa.	m	6 J.	3,92	1,90	34,2	60,1	5,7	Spur
Be.	m	7 J.	6,20	2,21	35,2	54,2	10,6	Spur
Ge.	w	7 J.	3,90	1,09	18,1	68,3	13,6	Spur
					31,8 ⁺ 7,02	57,5 ⁺ 6,47	10,9 ⁺ 2,65	
PRAEADOL.								
H., A.	m	8 9/12 J.	14,10	6,80	28,4	62,0	9,6	Spur
H., E.	m	9 9/12 J.	7,54	2,91	24,0	67,0	9,0	Spur
F., A.	m	10 J.	5,96	6,35	28,0	53,2	12,8	Spur
V., F.	m	10 J.	7,80	2,61	39,5	49,2	11,1	-
E., H.	w	11 J.	4,45	3,07	35,8	54,6	9,6	Spur
M., F.	m	11 8/12 J.	5,20	3,34	38,5	55,5	6,0	Spur
O., M.	w	11 8/12 J.	7,40	3,11	27,2	62,9	9,9	-
					31,6 ⁺ 7,12	57,7 ⁺ 6,30	9,68 ⁺ 2,29	

Tab. 3 - Fortsetzung

Name	Geschl.	Alter	Carb./ Kreat.	Carb.abs. mg/24 Std.	HmS	CSA	CSB	KS
ADOLESCENT								
A., J.	w	13 J.	2,89	2,74	22,5	60,5	17,0	Spur
H., M.	w	14 J.	1,47	0,96	29,0	58,2	12,8	Spur
C., T.	m	14 J.	2,25	2,65	21,2	68,1	10,7	Spur
P., G.	m	14 J.	4,14	2,23	19,5	61,0	19,5	Spur
S., S.	m	15 J.	3,29	1,64	28,6	52,2	19,2	Spur
S., H.	m	18 J.	1,56	0,99	27,2	53,0	19,8	Spur
R., H.	m	19 J.	1,09	1,82	26,8	59,0	14,2	Spur
					24,9 ⁺ 3,79	58,9 ⁺ 6,14	16,2 ⁺ 3,56	
ERWACHSENE								
B., H.	m	22 J.	2,40	2,57	24,5	54,1	21,4	Spur
K., C.	m	24 J.	0,64	1,26	31,4	45,6	23,0	Spur
R., T.	w	26 J.	1,92	0,50	24,3	60,0	15,7	Spur
N., A.	w	30 J.	1,06	0,69	24,8	57,0	18,2	-
G., K.	m	32 J.	1,18	0,83	20,8	52,8	26,8	-
S., H.	w	36 J.	0,91	1,21	30,5	52,8	16,7	Spur
S., A.	m	38 J.	1,19	3,49	38,0	51,3	10,7	Spur
R., G.	m	44 J.	1,33	0,49	22,8	54,4	22,8	-
W., J.	w	64 J.	1,32	1,31	26,6	57,3	16,1	-
					28,2 ⁺ 5,36	54,0 ⁺ 4,31	19,05 ⁺ 4,84	

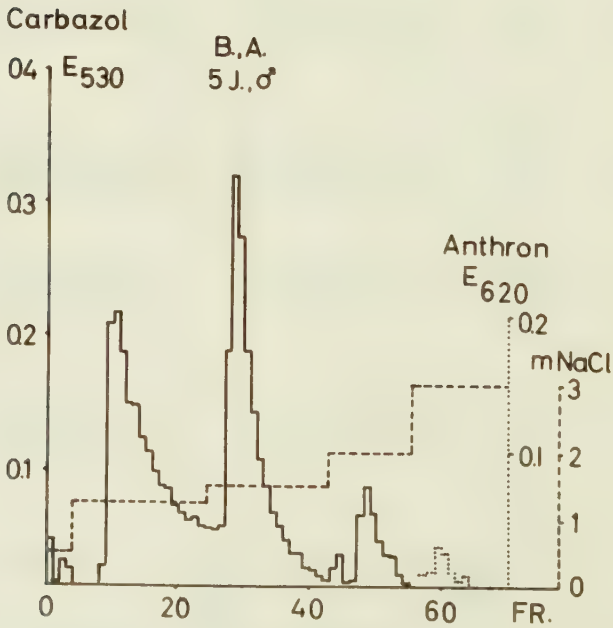
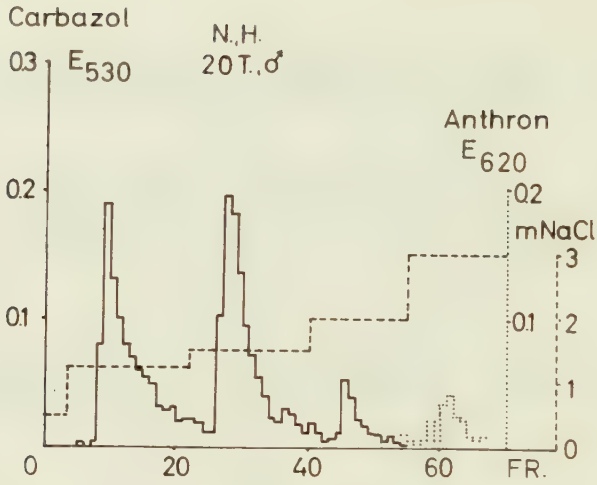


Abb. 4 a u. b: Mucopolysaccharid-Ausscheidungsmuster im Harn eines Säuglings (oben) und Kleinkindes (unten).
Der 1. Gipfel entspricht Heparitinsulfat, der 2. Chondroitinsulfat A, der 3. Chondroitinsulfat B und der 4. Keratosulfat.

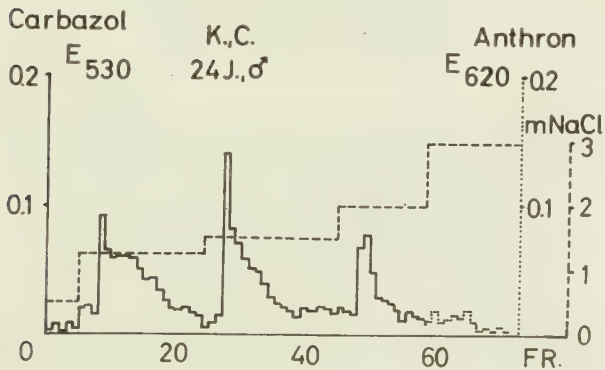
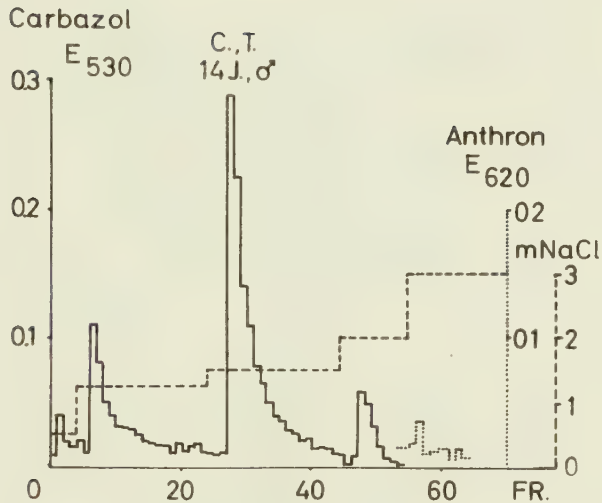


Abb. 4 c u. d: Mucopolysaccharid-Ausscheidungsmuster im Harn eines Adoleszenten (oben) und eines Erwachsenen (unten). Der 1. Gipfel entspricht Heparitinsulfat, der 2. Chondroitinsulfat A, der 3. Chondroitinsulfat B und der 4. Keratosulfat.

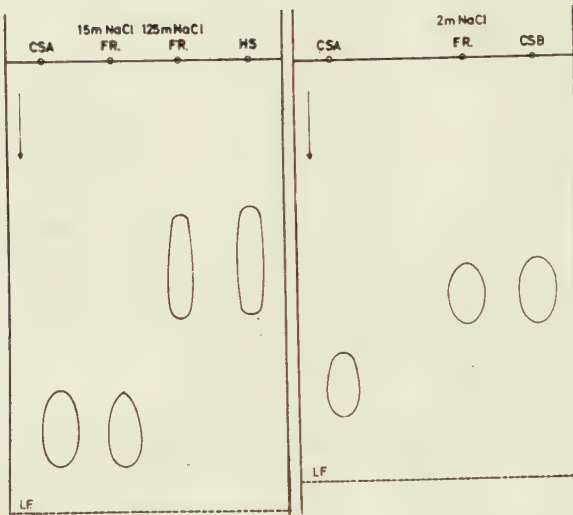


Abb. 5: Papierchromatogramm zum Versuch in Abb. 4c.
Parallel zu den gepoolten und eingeeengten Spitzenfraktionen der ersten drei Gipfel wurden Reinsubstanzen chromatographiert. Es entspricht Gipfel 1 dem Heparitinsulfat, Gipfel 2 dem Chondroitinsulfat A und Gipfel 3 dem Chondroitinsulfat B. Die gepunkteten Bezirke sind Verunreinigungen.

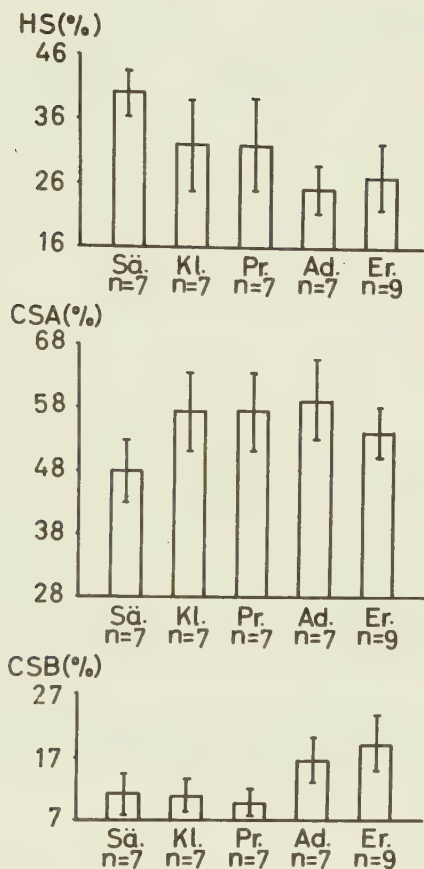


Abb. 6: Graphische Darstellung der relativen Anteile von Heparitinsulfat, Chondroitinsulfat A und Chondroitinsulfat B an der Gesamtpolysaccharidausscheidung in Abhängigkeit vom Alter.

Sä.: Säuglinge
Kl.: Kleinkinder
Pr.: Präadoleszenten
Ad.: Adoleszenten
Er.: Erwachsene.

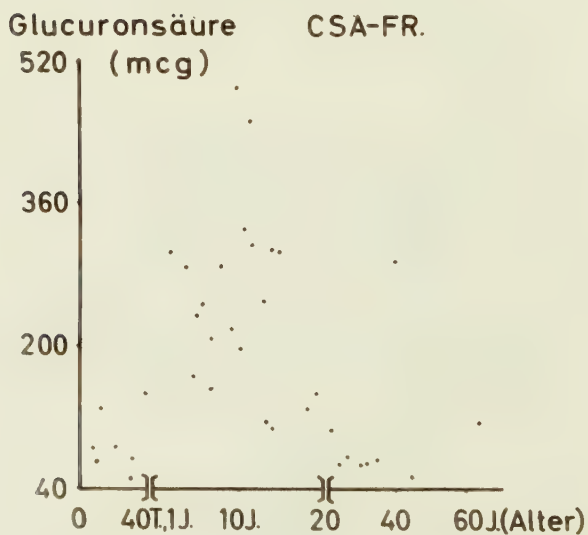
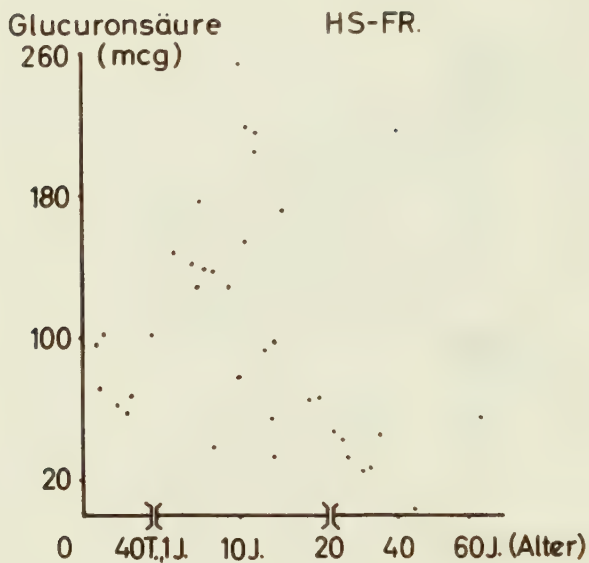


Abb. 7 u. 8: Gesamtausscheidung des Carbazol-positiven Materials in der 1,25 m (oben) und 1,5 m (unten) NaCl-Fraktion in Abhängigkeit vom Alter.

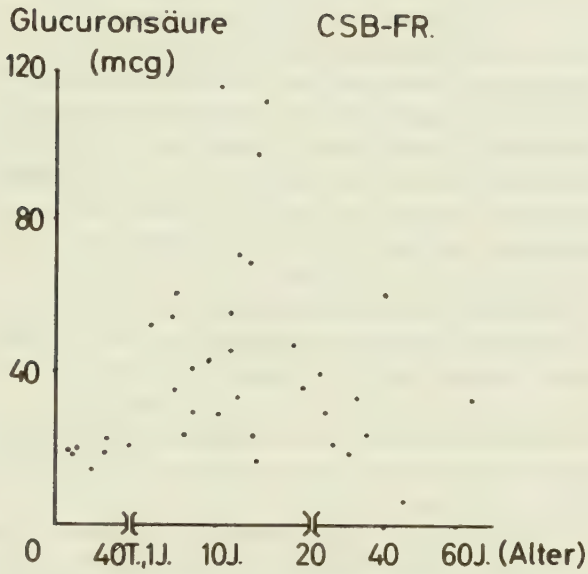


Abb. 9: Gesamtausscheidung des Carbazol-positiven Materials in der 2 m NaCl-Fraktion in Abhängigkeit vom Alter.

Die absolut größte SMP-Ausscheidung findet während der Pubertät statt; bezogen auf Kreatinin ist sie jedoch im Säuglingsalter am größten (s. Tab. 3).

Die altersabhängige Verschiebung der Ausscheidung für HS, CSA und CSB wurde in Abb. 6 graphisch aufgetragen. Es wird deutlich, daß vom Säuglings- bis zum Erwachsenenalter ein signifikanter Abfall ($p = 0,01$) der prozentualen HS-Ausscheidung erfolgt. Der größte Sprung vollzieht sich in den ersten Lebensjahren zwischen Säuglings- und Kleinkindesalter.

Der CSA (CSC)-Anteil an der SMP-Gesamtausscheidung steigt in der gleichen Lebensperiode leicht an ($p=0,05$), fällt jedoch beim Erwachsenen wieder etwas ab.

Die CSB Fraktion steigt von der ersten bis zur letzten Altersgruppe mit hoher Signifikanz ($p=0,01$) an.

Die absolute Ausscheidung von Carbazol-positivem Material der HS-, CSA- und CSB-Fractionen ist in Abb. 7 - 9 in Abhängigkeit vom Alter dargestellt. Die unterschiedliche Chromogenität von HS und CSB in der Carbazol-Reaktion (Te l l e r (1967)) wurde dabei nicht berücksichtigt. Man erkennt, daß während der Pubertät die absolute Ausscheidung von HS, CSA und CSB am größten ist.

V. Diskussion:

Bei der physiologischen Alterung erfahren viele Gewebe einen morphologischen Umbau. Die chemischen Vorgänge, die diesen Veränderungen zugrunde liegen, konnten für die SMP in den letzten Jahren etwas weiter geklärt werden. - Aus zahlreichen Untersuchungen (H o f f m a n n et al. (1958), M e y e r et al. (1956), S h e t l a r und M a s t e r s (1955) K a p l a n und M e y e r (1959), L a s h und W h i t e h o u s e (1960) und M a t h e w s und G l a g o v (1965)) geht hervor, daß der Gesamt-SMP-Gehalt des hyalinen Knorpels im Laufe des Lebens abnimmt. Die Analyse der SMP-Muster ergab mit steigendem Alter einen charakteristischen Anstieg von KS und eine Abnahme des CSA/CSC. Während im Rippenknorpel eines Neugeborenen kein KS, sondern fast ausschließlich CSA nachgewiesen werden konnte, war beim Erwachsenen CSA überwiegend durch CSC ersetzt und gleichzeitig KS linear bis zu 50 % des Gesamt-SMP-Gehaltes angestiegen (K a p l a n und M e y e r (1959)).

Auch im Gefäßsystem lassen sich charakteristische Altersveränderungen nachweisen. Besonders gut untersucht ist die Aorta. Ihr SMP-Gehalt nimmt während des Lebens zu, wobei der CSB-Anteil auf Kosten von HA anwächst (K a p l a n und M e y e r (1960) und B u d d e c k e (1960)). Diese Veränderung wird durch eine Hypertension beschleunigt (M a n l e y (1965)).

Vergleichende Untersuchungen an der Haut von Schweineembryonen und erwachsenen Tieren erbrachten ähnliche Ergebnisse. CSB nimmt im Laufe des Lebens um das ca. sechsfache zu, der HA-Anteil fällt dagegen von 78 auf 30 % ab (L o e w i und M e y e r (1958)).

Ein hoher CSB-Anteil an den Gesamt-SMP konnte von M e y e r et al. (1956) auch aus dem Bindegewebe er-

wachsener Menschen, so aus Herzklappen und Sehnen, isoliert werden.

Die absoluten Werte für SMP im Harn (mg/24 Std.) liegen bei uns ausnahmslos niedriger als in den Mitteilungen von L o e w i (1959), D i F e r r a n t e und R i c h (1956), K e r b y (1954) und T e l l e r et al. (1961). Diese Autoren geben eine Ausscheidung von 2-20 mg SMP/24 Std. als normal an. Zum Teil ist der Unterschied methodisch begründet, da hier für die Gesamtbestimmung 0,1 ml eines konzentrierten und unreinigten Materials verwandt wurde. Die mit dem Alter einhergehende Abnahme der SMP-Ausscheidung ist jedoch auch hier erkennbar und stimmt mit den Angaben aus der Literatur überein. (D i F e r r a n t e und R i c h (1956), R i c h et al. (1957), T e l l e r et al. (1962) und B e r e n s o n und D a l f e r e s (1965)).

Für den SMP-Kreatinin-Quotienten ergibt sich auch in unseren Untersuchungen eine vom Säuglings- zum Erwachsenenalter absteigende Linie. Die Werte liegen etwas niedriger als die von R i c h et al. (1957) und T e l l e r et al. (1962) angegebenen Normalbereiche.

CSA ist der Hauptbestandteil der sauren Mucopolysaccharide im Harn. Nach unseren Untersuchungen beträgt er ca. 50-60 %. Er entspricht damit der CSA/CSC-Menge, die B e r e n s o n und D a l f e r e s (1965) aus dem Harn isolierten.

Gute Übereinstimmung besteht auch mit den Angaben von S p r a n g e r, T o d t und W i e d e m a n n (1967), die eine Säulenchromatographische Trennung der Harn-SMP von 70 Personen verschiedenen Alters durchführten.

Unsere Werte liegen niedriger als in weiteren Angaben der Literatur, denen zufolge CSA etwa 80 % der Gesamt-SMP beträgt (D i f e r r a n t e und R i c h (1956), G i b i a n (1953), K e r b y (1954 und 58), L o e w i (1959) und L i n k e r und T e r r y (1963)).

Nach V a r a d i, C i f o n e l l i und D o r f m a n (1963) soll CSA/C sogar mit 90 % an den Harn-SMP beteiligt sein. K i n g et al. (1962) wiesen auf die Anwesenheit von HS im Normalharn hin. Bei B e r e n s o n und D a l f e r e s (1965) betrug die Heparinsulfat-Komponente 14-27 % der Gesamt-SMP. Die Untersuchungen wurden an 26-jährigen männlichen Normalpersonen durchgeführt.

Weitere Ergebnisse liegen auch von S p r a n g e r et al. (1967) vor, wonach die Normalwerte für HS zwischen 32 und 52,8 % der Gesamt-Carbazolmengen nach Säulenchromatographie betragen.

In den eigenen Untersuchungen schwankten die relativen Anteile von HS zwischen 18 und 46 %, bezogen auf alle Altersgruppen, und entsprechen somit weitgehend den Literaturangaben.

CSB wurde aus dem Normalharn von L i n k e r et al. (1962) und B e r e n s o n und D a l f e r e s (1965) isoliert. Letztere fanden bei den bereits oben erwähnten jungen männlichen Erwachsenen Werte zwischen 4 und 22 %, die mit unseren Ergebnissen gut korrelieren (7-26 %).

S p r a n g e r et al. (1967) fanden in ihren Untersuchungen einen CSB-Anteil von 7,1-18,0 %.

KS konnte mit unserer Methode nur in Spuren nachgewiesen werden.

Außer bei den angeborenen Erkrankungen des Mucopolysaccharidstoffwechsels (Mucopolysaccharidosen) läßt sich zur Zeit noch keine sichere Beziehung zwischen dem SMP-Muster des Harnes und dem altersabhängigen SMP-Gehalt verschiedener Bindegewebe herstellen. Es kann die Frage, ob eine Veränderung des SMP-Musters im Körper anhand der SMP-Ausscheidung im Harn erfaßbar ist, noch nicht beantwortet werden. Aus Versuchen von L a y t o n (1951), L i k a r et al.(1963) und D o r f m a n (1962) geht hervor, daß beispielsweise Cortisonverbindungen trotz einer starken Wirkung auf den SMP-Stoffwechsel im Gewebe die SMP-Ausscheidung nahezu unverändert lassen. K a p l a n und M e y e r (1963) fanden in Wiederfindungsversuchen mit i.v. injizierten,radioaktiv markierten SMP im Harn einen relativ hohen Prozentsatz der injizierten Menge an CSB, jedoch nur geringe Ausscheidung von CSA/CSC: Bei einmaliger Injektion stieg nur die CSB Exkretion um 30 % an, bei mehrmaliger Injektion wurde CSC um 11 %, CSB um 30 % und HS um 39 % vermehrt ausgeschieden. Es wurde weiterhin bei einer CSB-Dauerinfusion eine vermehrte HS-Ausscheidung gefunden.

Die hohe Harnfähigkeit für CSB und die Altersverschiebung des SMP-Musters im Gefäßsystem und in der Haut lassen eine gewisse Korrelation mit unseren Ergebnissen zu. Im Gegensatz zu der HS- und CSA-Ausscheidung fanden wir für CSB im Harn mit zunehmendem Alter einen signifikanten Anstieg.

Die Gesamt-SMP im Harn nehmen nach der Pubertät kontinuierlich ab, was in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten steht. Man könnte eine Parallele zur Abnahme des SMP-Gehaltes im hyalinen Knorpel mit steigendem Alter ziehen, doch steigt auf der anderen Seite der SMP-Gehalt der Gefäßwände in gleichem Zeitraum an.

Der altersabhängige Ersatz von CSA durch CSC im Rippenknorpel könnte sich in den Ergebnissen von B e r e n s o n und D a l f e r e s (1965) widerspiegeln: Der Prozentsatz von CSC im Harn von Erwachsenen war mehr als dreimal so groß wie der Gehalt an CSA. In welchem Mengenverhältnis CSC und CSA im Harn von Säuglingen bis Adoleszenten ausgedrückt wird, ist noch nicht untersucht worden.

Bezüglich der von uns gefundenen signifikanten Abnahme der HS-Ausscheidung mit zunehmendem Alter liegen auch ähnliche Werte von S p r a n g e r et al. (1967) vor. Weitere Hinweise über eine HS-Abnahme im Harn mit zunehmendem Alter sind in der Literatur nicht vorhanden.

VI. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ausscheidung einzelner saurer Mucopolysaccharide (SMP) im 24-Std.-Harn von 37 Normalpersonen im Alter zwischen 8 Tagen und 64 Jahren untersucht. Nach Fällung mit Cetylpyridinchlorid erfolgte eine säulenchromatographische Fraktionierung des SMP-Materials an Dowex 1 X 2. Heparitinsulfat konnte mit 1,25 m, Chondroitinsulfat A mit 1,5 m, Chondroitinsulfat B mit 2 m und Keratosulfat mit 3 m NaCl eluiert werden. Die anschließende colorimetrische Bestimmung der SMP erfolgte mit der Carbazol-Reaktion auf Hexuronsäuren und mit der Anthron-Reaktion auf Neutralzucker. Mit zunehmendem Alter ergab sich ein Abfall der relativen Heparitinsulfat-Ausscheidung bei gleichzeitigem Anstieg des Chondroitinsulfat-B-Anteils. Diese Veränderungen waren statistisch signifikant ($p = 0,01$) zwischen dem Säuglingsalter (Gruppe I) und Erwachsenenalter (Gruppe V). Sowohl für Heparitinsulfat als auch für Chondroitinsulfat B lag der Gipfel der absoluten Ausscheidung während der Pubertät. Der Chondroitinsulfat-A-Prozentsatz stieg zwischen dem Säuglings- und Kleinkindesalter nicht eindeutig signifikant an ($p = 0,05$). Er fiel bei Erwachsenen wieder leicht ab. Die absolute Ausscheidung von Chondroitinsulfat A war auch während der Pubertät am größten. Keratosulfat wurde in allen Altersgruppen nur in Spuren nachgewiesen.

VII. Literaturverzeichnis

- ASTRUP, P.: On the determination of heparin in blood plasma and urine.
Acta Pharmacol. 3, 165 (1947)
- BERENSON, G.S., and E.R. DALFERES:
Urinary excretion of mucopolysaccharides in normal individuals and in the Marfan Syndrome.
Biochim. Biophys. Acta 101, 183 (1965)
- BERENSON, G.S. and M.T. SERRA:
Mucopolysaccharides in urine from patients with Marfan's Syndrome.
Fed. Proc. 18, 190 (1959)
- BERNARDI, G.: The molecular size, shape and weight of mucoprotein from cartilage.
Biochim. Biophys. Acta (Amst) 26, 47 (1957)
- BONOMO, E. and P. CERRETELLI:
Sul comportamento dei glicoprotidi urinari nelle malattie reumatiche e in alcune altre condizioni morbose.
Reumatismo 9, 98 (1957)
- BOYD, E.S. and W.F. NEUMAN:
The surface chemistry of bone.
J. Biol. Chem. 193, 243 (1951)
- BRANTE, G.: Gargoylism: a mucopolysaccharidosis.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 4, 43 (1952)
- BUDDECKE, E.: Untersuchungen zur Chemie der Arterienwand.
5. Darstellung und chemische Zusammensetzung von Mucopolysacchariden der Aorta des Menschen.
Z. Physiol. Chem. 318, 33 (1960)

DAVIDSON, E.A. and K. MEYER:

Structural studies on chondroitin sulfuric acid. 1. The nature of chondrosine.
J. Am. Chem. Soc. 76, 5686 (1954)

DELBRÜCK, A., H. GRIMME und K. WETTE:

Zur Ausscheidung saurer Mucopolysaccharide im Harn.
I. Mitteilung: Methode und Normalwerte.
II. Mitteilung: Ausscheidung bei pathologischen Zuständen der Bindegewebe verschiedener Genese.
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 5, 10-16 (1967)

DI FERRANTE, H., and C. RICH:

The mucopolysaccharides of normal human urine.
Clin. Chim. Acta 1, 519 (1956)

DI FERRANTE, N., and C. RICH:

The determination of acid mucopolysaccharides in urine.
J. Lab. Clin. Med. 48, 491 (1956)

DI FERRANTE, N., W.C. ROBINSON, and C. RICH:

Urinary excretion of acid mucopolysaccharides by patients with lupus erythematosus.
J. Lab. Clin. Med. 50, 897 (1957)

DI FERRANTE, N.:

Urinary excretion of acid mucopolysaccharides by patients with rheumatoid arthritis.
J. Clin. Invest. 36, 1516 (1957)

DORFMAN, A., and L.M. OTT:

A turbidimetric method for the assay of hyaluronidase.
J. Biol. Chem. 172, 367 (1948)

DORFMAN, A., and A.E. LORINCZ:

Occurrence of urinary acid mucopoly-
saccharides in the Hurler Syndrome.
Proc. Natl. Acad. Sci. 43, 443 (1957)

DORFMAN, A.:

Studies on the biochemistry of connective
tissue.
Pediatrics 22, 576 (1958)

DORFMAN, A.:

Polysaccharides of connective tissue.
J. Histochem. Cytochem. 11, 2 (1962)

DULCE, H.J.:

Mineralgehalt und Grundsubstanzzusammen-
setzung des hyalinen Knorpels, des verknö-
cherten Knorpels und des Knochens.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 319, 257 (1960)

DUNPHY, J.E., and K.N. UDUPA:

Chemical and histochemical sequences in
the normal healing of wounds.
New Engl. J. Med. 253, 847 (1955)

DZIEWIATKOWSKI, D.D., R.E. BENESCH, and R. BENESCH:

On the possible utilization of militate
sulfur by the suckling rat for the syn-
thesis of chondroitin sulfate as indicated
by the use of radioactive sulfur.
J. Biol. Chem. 178, 931 (1948)

DZIEWIATKOWSKI, D.D.: Radioautographic studies of sulfate-

sulfur (S^{35}) metabolism in the articular
cartilage and bone of suckling rats,
J. Exptl. Med. 95, 489 (1952)

DZIEWIATKOWSKI, D.D.: Sulfate-sulfur metabolism in the rat

fetus as indicated by sulfur-35.
J. Exptl. Med. 98, 119 (1953)

- SILMAN, R.: Das Vorkommen von Hyaluronsäure im Harn im Zusammenhang mit ihrem vermuteten Einfluß auf die Harnsteinbildung. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 292, 117(1953)
- GROSS, J.I., M.B. MATHEWS, and A. DORFMAN: Sodium chondroitin sulfate-protein complexes of cartilage. 2. Metabolism. J. Biol. Chem. 235, 2889 (1960)
- GROSSMAN, B.J., and A. DORFMAN: In vitro comparison of the antithrombotic action of heparin and chondroitin sulfuric acid B Pediatrics 20, 506 (1957)
- HARUKI, F., and J.K. KIRK: Improved procedure for separation and assay of individual acid mucopolysaccharides(Abstract) 6th Int. Congress of Biochem. N.Y. (1964)
- HAUSS, W.H., G., JUNGE-HÜLSING und F. KÖNIG: Über das Vorkommen von Veränderungen des Mucopolysaccharidstoffwechsels in der Klinik. I. Mitteilung: Klinische Beobachtungen zur unspezifischen Mesenchymreaktion. Med. Welt 45, 2371 (1962)
- HAUSS, W.H., G., JUNGE-HÜLSING und F. KÖNIG: Über das Vorkommen von Veränderungen des Mucopolysaccharidstoffwechsels in der Klinik. II. Mitteilung: Klinische Beobachtungen zur unspezifischen Mesenchymreaktion bei Arteriosklerose, insbesondere bei Herzinfarkt. Med. Welt 3, 125 (1963)

HOFFMAN, P., A. LINKER, and K. MEYER:

The acid mucopolysaccharides of connective tissue 3. The sulfate linkage.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 30, 184 (1958)

JEANLOZ, R.W.: Structure of heparin.
Fed. Proc. 17, 108 (1958)

KAPLAN, D., and K. MEYER: Ageing of human cartilage.
Nature (London) 183, 1267 (1959)

KAPLAN, D., and K. MEYER: Mucopolysaccharides of aorta at various ages.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 105, 78 (1960)

KAPLAN, D., and K. MEYER: The fate of injected mucopolysaccharides.
J. Clin. Invest. 41, 743 (1962)

KERBY, G.P.: The excretion of glucuronic acid and acid mucopolysaccharides in normal human urine.
J. Clin. Invest. 33, 1168 (1954)

KERBY, G.P.: The distribution of acid mucopolysaccharides in Cohn fractions of human plasma proteins.
J. Clin. Invest. 37, 678 (1958)

KING, J.S., M.L. FIELDEN, and W.R. BOYCE:
Acid mucopolysaccharide in normal urine.
Clin. Chim. Acta 7, 1316 (1962)

KOBAYAS, T.: Polysaccharides from urine.
J. Biochim. (Tokyo) 28, 31 (1958)

LASH, J.W., and M.W. WHITEHOUSE:
Variation in the polysaccharide. Composition of cartilage with age.
Arch. Biochem. Biophys. 90, 159 (1960)

- LAYTON, L.L.: Effects of cortisone upon chondroitin sulfate synthesis by animal tissues.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 76, 596 (1951)
- LIKAR, L.J., M.M. MANSON, and H. ROSENKRANTZ:
Response of the level of acid mucopolysaccharides in rat granulation tissue to cortisol.
Endocrinology 72, 393 (1963)
- LINKER, A., K.D. TERRY, and W. TELLER:
Mucopolysaccharides of normal urine and of Hurler's Syndrome.
Fed. Proc. 21, 170 (1962)
- LINKER, A., and K.D. TERRY:
Urinary acid mucopolysaccharides in normal man and in Hurler's Syndrome.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 113, 743 (1963)
- LOEWI, G., and K. MEYER: The acid mucopolysaccharides of embryonic skin.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 27, 453 (1958)
- LOEWI, G.: Urinary excretion of acid polysaccharide in rheumatoid arthritis and other diseases.
Ann. Rheum. Dis. 18, 239 (1959)
- LORINCZ, A. E., and A. DORFMAN:
Occurrence of urinary acid mucopolysaccharides in the Hurler Syndrome.
Am. J. Dis. Child. 94, 552 (1957)
- LORINCZ, A.E.: Urinary acid mucopolysaccharides in hereditary deforming chondrodysplasia (diaphysial aclasis).
Fed. Proc. 19, 148 (1960)

- LORINCZ, A.E.: Heritable disorders of acid mucopolysaccharide metabolism in human and snorter dwarf cattle. Ann. N.Y. Acad. Sc. 91, 644 (1961)
- MANLEY, G.: Changes in vascular mucopolysaccharides with age and blood pressure. Brit. J. Exp. Path. 46, 125 (1965)
- MARBET, R. und A. WINTERSTEIN:
Probleme der Blutgerinnung. 4. Mitteilung:
B-Heparin, ein neuer blutgerinnungshemmender
Mucoitinschwefelsäureester.
Helv. Chim. Acta 34, 2311 (1951)
- MAROTEAUX, P. et M. LAMY: Opacités cornéennes et troubles métaboliques dans la maladie de Morquio. Rev. Franç. Etudes Clin. Biol. 6, 481 (1961)
- MAROTEAUX, P. et M. LAMY: Fractionnement des mucopolysaccharides urinaires dans la maladie de Morquio. C.r.Acad. Sc. 256, 5644 (1963)
- MATHEWS, M.B., and A. DORFMAN:
The molecular weight and viscosity of
chondroitin sulfuric acid.
Arch. Biochem. Biophys. 42, 41 (1953)
- MATHEWS, M.B., and I. LOZAITYTE:
Sodium chondroitin sulfate - protein complexes
of cartilage. 1. Molecular weight and shape.
Arch. Biochem. Biophys. 74, 158 (1958)
- MATHEWS, M.B., and S. GLAGOW: Acid mucopolysaccharide patterns in aging human cartilage. Fed. Proc. 24, 354 (1965)

- MEYER, K., E. DAVIDSON, A. LINKER, and P. HOFFMAN:
The acid mucopolysaccharides of connective tissue.
Biochim.Biophys.Acta (Amst.) 21, 506 (1956)
- MEYER, K.:
Chemical structure of hyaluronic acid.
Fed. Proc. 17, 1075 (1958)
- MEYER, K., M.M. GRUMBACH, A. LINKER, and P. HOFFMAN:
Excretion of sulfated mucopolysaccharide in gargoylism (Hurler's Syndrom)
Proc.Soc.Exp.Biol.(N.Y.) 97, 275 (1958)
- MEYER, K., P. HOFFMAN, A. LINKER, M.M. GRUMBACH, and P.SAMPSON:
Sulfated mucopolysaccharides of urine and organs in gargylism. (Hurler's Syndrome)
Proc.Soc.Exp.Biol. (N.Y.) 102, 587 (1959)
- MEYER, K., D. KAPLAN, and G.K. STEIGLEDER:
Effect of acid mucopolysaccharides in hair growth in the rabbit.
Proc.Soc.Exp.Biol. (N.Y.) 108, 59 (1961)
- MITTENECKER, E.:
Planung und statistische Auswertung von Experimenten.
Verlag Franz Deuticke, Wien (1964).
- MÖRNER, K.A.H.:
Untersuchungen über die Proteinstoffe und die eiweißfällenden Substanzen des normalen Menschenharnes.
Skand. Arch. Physiol. 6, 332 (1895)
- PIPER, J.:
The fate of heparin in rabbits after intravenous injection. Filtration and tubular secretion in the kidneys.
Acta Pharmacol. 3, 373 (1947)

- RECHENBERGER, J.: Zur Alters- und geschlechtsdifferenten Ausscheidung saurer Mucopolysaccharide im Harn. Z. Altersforsch. 14, 314 (1960)
- RICH, C., N. DI FERRANTE, and R.M. ARCHIBALD:
Acid mucopolysaccharide excretion in the urine of children.
J. Lab. Clin. Med. 50, 686 (1957)
- RICH, C., and W.P.L. MYERS: Excretion of acid mucopolysaccharides in the urine of patients with malignant neoplastic diseases.
J. Lab. Clin. Med. 54 223 (1959)
- SCHILLER, S., and G.A. SLOVER:
Method for separation of mucopolysaccharides from rat skin.
Fed. Proc. 19, 148 (1960)
- SCHILLER, S., G.A. SLOVER, and A. DORFMAN:
A method for the separation of acid mucopolysaccharides: Its application to the isolation of heparin from the skin of rats.
J. Biol. Chem. 236, 983 (1961)
- SHETTLAR, M.R., and Y.F. MASTERS: Effect of age on polysaccharide composition of cartilage.
Proc.Soc.Exp.Biol. (N.Y.) 90, 31 (1955)
- SPRANGER, J., H. TODT und H.R. WIEDEMANN:
Untersuchungen zur Zusammensetzung der Urin-Mucopolysaccharide bei Kindern und Erwachsenen.
Clin. Chim. Acta 17, 142 (1967)
- TANNER, J.M.: Wachstum und Reifung des Menschen.
Thieme Verlag, Stuttgart (1962)

TELLER, W.M., J.W. ROSEVEAR and E.C. BURKE:

Identification of heterozygous carriers
of gargolism.

Proc.Soc.Exp.Biol.(N.Y.)108, 276 (1961)

TELLER, W.M., E.C. BURKE, J.W. ROSEVEAR and B.F. MCKENZIE:

Urinary excretion of acid mucopolysaccharides in normal children and patients with gargolism.

J. Lab. Clin. Med. 59, 95 (1962)

TELLER, W. und A. ZIEMANN: Die säulenchromatographische

Fraktionierung der sauren Mucopolysaccharide im Harn.

Klin. Wschr. 44, 1142 (1966)

TELLER, W.:

Kolorimetrischer Nachweis von Chondroitinsulfat B im Gemisch mit anderen sauren Mucopolysacchariden.

Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 5, 29 (1967)

THOMPSON, G.R., and C.W. CASTOR:

The excretion of nondialyzable urinary mucopolysaccharide in rheumatic and other systemic disease states.

J. Lab. Clin. Med. 68, 617 (1966)

VARADI, D.P., J.A. CIFONELLI, and A. DORFMAN:

Acid mucopolysaccharides in normal urine.

Fed. Proc. 22, 412 (1963)

WEBBER, R.V., and S.T. BAYLEY:

Some observations on the molecular form of chondroitin sulfate.

Cand. J. Biochem. Physiol. 34, 993 (1956)

Herrn Prof. Dr. F. Linneweh, Direktor der
Universitätskinderklinik, Marburg,
danke ich für die Überlassung eines Ar-
beitsplatzes in seiner Klinik und
Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Teller für die
Überlassung des Themas der Dissertation,
sowie für seine hilfreichen Anregungen
und die Durchsicht des Manuskriptes.

Lebenslauf

Am 10. April 1942 wurde ich, Christian Krüger, z.Zt. wohnhaft in Eishausen (Westf.) als Sohn eines Landwirtes in Schöneu (Pom.) geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Bermbeck und Kirchlengern kam ich 1953 auf das math.-nat. Gymnasium in Bad Salzuflen. 1956 wurde ich in die Freiherr-vom-Stein-Schule in Oldenburg (Holst.) umgeschult, die ich Ostern 1962 mit dem Reifezeugnis verließ. Von 1962-1964 absolvierte ich mein vorklinisches Studium an der Universität in Göttingen, wo ich 1964 das Physikum bestand. Im Wintersemester 1964/65 studierte ich an der Medizinischen Fakultät in München. Seit Mai 1965 bin ich an der Medizinischen Fakultät in Marburg eingeschrieben und habe mich für das Sommersemester 1967 zum Staatsexamen gemeldet.

Marburg, den 4.1.1968

Christian Krüger

Meine akademischen Lehrer waren die Herren
Professoren und Dozenten:

in Göttingen: Ax, Blechschmidt, Brockmann,
Deuticke, Flammersfeld, Glees,
Glemser, Hilsch, Hinrichsen,
Kramer, Pirson, Rath, Schuchardt,
Thiele, Wieser.

in München: Büngeler, Doutenwill, Eder,
Eyer, Georgii, Grill, Leibbrand,
Mehnert, Novy, Schwiegk, Semm,
Waidl, Wieland, Zöllner.

in Marburg: Beckmann, Berendes, Bommer,
Braun-Falco, Buchholz, Dölle,
Exner, Gedigk, Hamm, Hettler,
Heuser, Hildebrandt, Jacob,
Knauff, Linneweh, Löhr, Lübbers,
Mann, Martini, Marx, du Mesnil
de Rochemont, Neubauer, Petzold,
Rohen, Sauer, Schiff, Schleyer,
Schlosser, Schmidt, Schrappe,
Schwaiger, Siegert, Siess,
Straub, Streicher, Teller,
Würterle.

